

에탄올 발효에서의 온도의 영향 및 발효공정의 최적화

박종경¹ · 백승윤 · 유영제*

서울대학교 공과대학 화학공학과, ¹태평양화학(주) 생명공학연구소

Temperature Effects and Optimization for Ethanol Fermentation

Park, Jong-Kyung¹, Seung-Yoon Peck and Young J. Yoo*

Department of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul, Korea

¹Biotechnology Lab., Korea Pacific Chemical Co., Seoul, Korea

The effects of temperature on yeast growth and ethanol production were investigated in batch cultures. The maximum specific growth rate of yeast was obtained at 36°C and the maximum specific production rate of ethanol was obtained at 33°C. A mathematical model was employed to describe the temperature effects in ethanol fermentation and the parameters in the model were expressed as a function of temperature. Optimum temperature control strategy, from the simulation result, consists of starting the fermentation at high temperature and lowering the temperature as the fermentation proceeds.

최근 대체에너지로서 다루기가 용이하고 대기오염도가 낮고 원료의 계속적인 공급이 가능한 에탄올에 대한 관심이 높아지고 있다. 에탄올 발효에서는 원료물질의 비용이 제품의 값에 가장 큰 비중을 차지하므로 높은 에탄올 수율을 얻는 것이 중요하며 또한 증류에 있어서 스티미비용이 차지하는 비중도 크므로 (1) 적합한 미생물 균주의 선택과 우수한 발효공정기술의 확립이 요구된다. 에탄올의 생산성을 증가시키는 데는 어느 정도의 한계가 있는데 즉 발효액 내의 에탄올 농도가 증가하면 생성된 에탄올에 의한 저해작용(ethanol inhibition)이 나타나 효모의 성장 및 에탄올 생성을 억제하고 효모의 활성을 감소시킨다. 따라서 에탄올 발효에서 에탄올의 저해작용을 감소시키고 에탄올 생산성을 높이기 위해서는 온도의 영향을 정확히 분석하는 것이 필요하다. Ciftci 등(2)은 온도가 증가(20-40°C 범위내)함에 따라 비생산속도는 증가하고, 45°C 이상에서는 inactivation이 심하다는 사실을 발표했고 Loureiro 과 Van Uden(3), Sacorreia 와 Van Uden(4)은 에탄올 농도가 증가함에 따라 효모가 성장할 수 있는 최고 온도는 감소한다는 사실을 발표했으며, Nanba 등(5)

은 에탄올 발효에서 배양온도가 낮으면 효모성장이 느려지고 에탄올 생산이 저하되지만 최종 세포농도와 최종 에탄올 농도는 높은 배양온도의 경우보다 높은 수준에 도달한다는 현상을 설명하기 위해 enzyme deactivation kinetics에 기초를 둔 model을 제안했다.

에탄올은 여러가지 효소와 세포의 물리적인 기능에 관여를 하는데 특히 세포막에 가장 강하게 작용한다. 즉 세포막에 손상을 주고 세포막의 성질을 변화시킨다(6). 또한 효소수준에서 보면 에탄올은 일반적으로 탈수효과(dehydration effect)가 있고 alcohol dehydrogenase 와 hexokinase 등과 같은 특별한 효소에 저해작용을 하는 것으로 보고되었다(7). 에탄올 발효에서 에탄올이 세포막을 통과해서 밖으로 이동하는 속도보다 빠르게 에탄올이 생산되므로 세포내 에탄올 농도가 배지 내의 에탄올 농도보다 높게 된다(7). 대부분의 효모에서 세포자체의 내성(intrinsic tolerance)은 원형질막(plasma membrane)의 능력에 관계가 있는 것으로 나타나 있다(8).

산업적인 에탄올 발효에서는 높은 발효속도가 요

Key words: Ethanol, temperature effects, optimization, yeast, modeling

*Corresponding author

구되는데 높은 발효속도는 에탄올 발효의 발열적인 성질로 인해 많은 열을 수반한다(149.5 cal/g-sucrose 또는 140.2 cal/g-glucose). 조작온도의 선택은 생리적인 인자와 고온에서의 에탄올의 증발손실 및 기포의 생성 등과 같은 물리적인 요인에 영향을 받는다. 발효온도가 높으면 효모성장속도 및 에탄올 생성속도는 증가되나 최종 에탄올 농도는 저하되며, 발효온도가 낮으면 효모성장속도 및 에탄올 생산속도는 감소하나 최종 에탄올 농도는 높은 수준에 도달한다(5). 효모가 성장할 수 있는 최대 온도 근처에서의 배양은 원형질막의 불안정을 초래하고 또한 세포활성의 급격한 감소를 초래한다(9). *Saccharomyces* 균주를 사용하는 발효에 있어서 에탄올 생합성 속도만을 고려하는 경우의 최적 온도는 효모의 성장을 위한 최적 온도보다 5-10°C 높은 것으로 보고되었으나(10) 실제 회분식 발효에서의 최적 온도는 에탄올 저해작용 때문에 효모의 성장을 위한 최적 온도보다 낮다(5). 본 논문에서는 에탄올 발효에 있어서의 온도의 영향을 정량적으로 규명하였으며 모델링을 이용하여 최적의 발효온도를 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

에탄올 발효를 위한 균주로서 상업용 Baker's yeast를 사용하였다. 배지의 조성은 glucose, 100 g/l; KH_2PO_4 , 1 g/l; NaCl, 1 g/l; MgSO_4 , 0.7 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4 g/l 그리고 yeast extract, 2 g/l이다. 사용한 glucose는 Sigma사 제품을 사용했고 나머지 시약은 Junsei, Nakarai, Wako사 등의 GR 또는 EP 등급의 것을 사용하였다.

배 양

250 ml 삼각플라스크를 이용하여 100 g/l의 포도당을 포함한 배지 100 ml에 Baker's yeast를 접종하여 shaking incubator에서 150 rpm, 30°C로 24시간 배양하였다. 온도 영향에 관한 실험은 3l 발효조를 이용했으며 working volume은 1l로 하였다. 플라스크 배양을 한 발효액 50 ml을 접종하여 포도당이 고갈될 때까지(약 24시간) 배양하였다. 배양조건은 pH는 5.0으로 공기는 0.5 vvm으로 공급하였고 온도는 30-39°C의 영역에서 제어하고자 하는 온도로 제어를 하였다.

분석방법

세포농도는 분광광도계(Bausch & Lomb, Spec-

tronic 20)를 사용하여 525 nm에서 optical density를 측정하여 보정곡선으로부터 결정하였다.

포도당 농도는 DNS method(11)를 사용하여 측정하였다. 원심분리한 시료의 상등액 1 ml를 취하여 DNS(dinitrosalicylic acid) colour reagent 1 ml를 첨가하여 100°C에서 약 5분간 반응시킨 후 식힌 다음 10 ml의 증류수를 첨가하여 546 nm에서 optical density를 측정하였다.

에탄올 농도의 측정은 배양액을 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였으며 column 물질은 Porapak Q이고 TCD(thermal conductivity detector)를 가진 gas chromatography(Yanaco G-1800)를 사용하였다.

결과 및 고찰

회분식 배양

에탄올 발효에서 온도의 영향을 알아보기 위해 온도를 30-39°C 사이에서 3°C씩 변화시켜 가면서 회분식 배양을 하였다. 각 온도에서 회분식 배양을 하였을 때의 미생물의 성장, 에탄올 생산, 포도당 소모 형태 등을 Fig.1에 나타내었다. 회분식 배양 결과로부터 비성장속도, 비생산속도, 에탄올 생산성, 그리고 성장수율을 얻었으며 이 결과는 Table 1에 나타내었다. 비성장속도는 30-60°C 사이에서는 온도가 증가함에 따라 증가하다가 36°C를 기점으로 하여 감소함을 볼 수 있었고, 에탄올 비생산속도는 33°C 이하에서는 온도가 증가함에 따라 증가하다가 33°C를 기점으로 하여 온도가 증가하여도 감소하였다. 즉 미생물 성장의 최적 온도는 36°C 근처이며 에탄올 생성속도는 33°C 근처에서 최적임을 보여주고 있다. 그리고 에탄올에 의한 미생물 성장 및 에탄올 생산에 대한 저해작용은 36°C를 기점으로 그 이상의 온도에서는 저해작용이 크게 증가되고 있음을 알 수 있다. 이러한 실험결과는 에탄올 발효에서의 최적

Table 1. Effects of temperature on alcohol fermentation.

Temperature (°C)	Overall specific growth rate (hr ⁻¹)	Overall specific production rate (g/g/hr)	Overall ethanol productivity (g/l/hr)	Overall growth yield coefficient
30	0.094	0.531	1.269	0.058
33	0.115	0.604	1.604	0.066
36	0.129	0.572	1.560	0.074
39	0.091	0.468	1.060	0.063

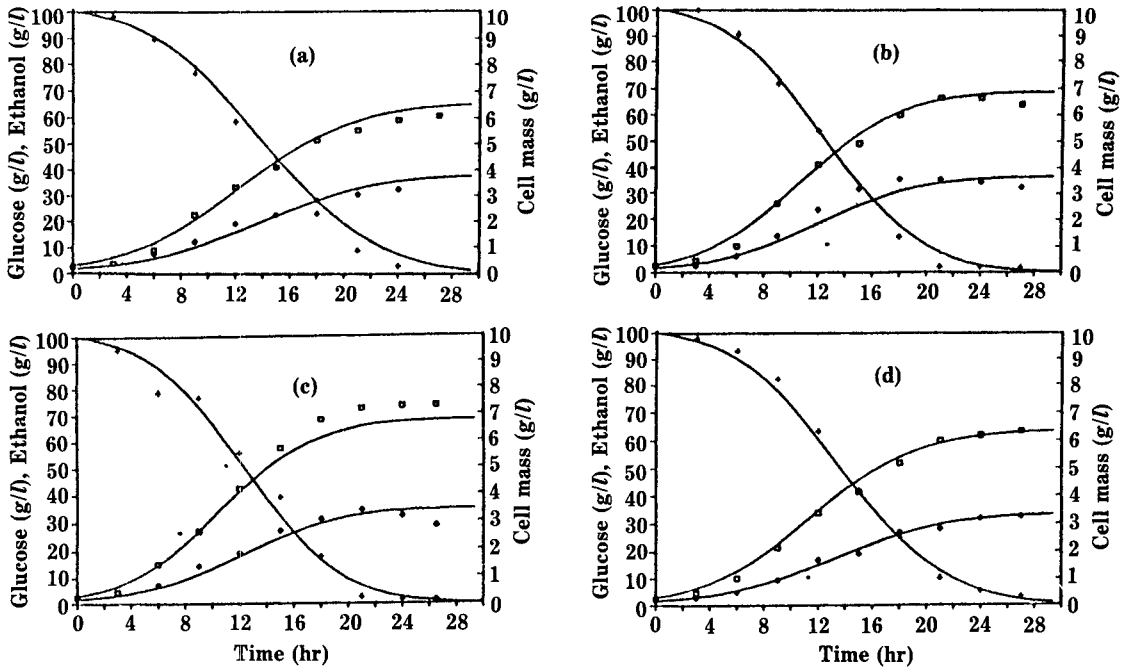


Fig. 1. Experimental data with simulation results.
 (a) Temp. = 30°C, (b) Temp. = 33°C, (c) Temp. = 36°C, (d) Temp. = 39°C
 Experimental data (+ : glucose, ◇ : ethanol, □ : cell mass)

온도가 33-34°C로 보고된 기존의 결과(12)와 일치하는 것이다.

수학적 모델링

에탄올 발효에서 균체성장, 기질소모, 에탄올 생성 등을 모사하기 위하여 발표된 모델식(13, 14) 중에서 다음의 모델식(13)을 이용하였다.

$$\frac{dX}{dt} = \mu m \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^\alpha \frac{S}{S + K_s} X \tag{1}$$

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \tag{2}$$

$$\frac{dP}{dt} = V_m \left(1 - \frac{P}{P'm}\right)^\beta \frac{S}{S + K's} X \tag{3}$$

본 실험은 포도당 농도가 100 g/l 인 경우에 대하여 에탄올을 생산한 것이므로 모델식에 있어서 포도당에 의한 기질 저해작용은 고려하지 않았다. 매개변수는 실험결과와 문헌값을 참고하여 추정하였으며 결과는 Table 2에 나타내었다. Luong(13)은 $P_m = 112 \text{ g/l}$, $P'm = 115 \text{ g/l}$ 로 보고하였으며, Aiba 등(14)은 $P_m = 68 \text{ g/l}$, $P'm = 112 \text{ g/l}$ 로 보고하였다. 이러한 값들은 균주의 종류, 미생물의 생리적인 특성 및 배양상태에 따라 다른 것으로 판단된다. 각

Table 2. Estimated parameter values for the mathematical model.

	30 (°C)	33 (°C)	36 (°C)	39 (°C)
μm (/hr)	0.33	0.365	0.40	0.347
V_m (g/g/hr)	1.40	1.472	1.35	1.249
$Y_{p/s}$	0.32	0.34	0.33	0.31
P_m (g/l)	80	80	75	65
$P'm$ (g/l)	119	119	115	100

온도에서의 매개변수 $-\mu m$, V_m , P_m , $P'm$, $Y_{p/s}$ 를 구하여 이를 추정된 변수를 사용하여 모델식 (1)-(3)을 Runge-Kutta 방법으로 simulation을 한 결과 Fig.1에서와 같이 실험결과와 잘 일치함을 알 수 있었다. 온도의 영향을 모델식에 포함시키기 위하여 Table 2의 결과를 이용하여 (4)와 같이 매개변수를 온도의 함수로 나타내었다(단, α 및 β 는 각각 3으로 고정시켰으며 K_s 및 $K's$ 는 각각 25로 고정시켰다.).

$$\mu m = -2.6142 + 0.1712T - 0.00244T^2$$

$$V_m = -3.6291 + 0.3120T - 0.0048T^2$$

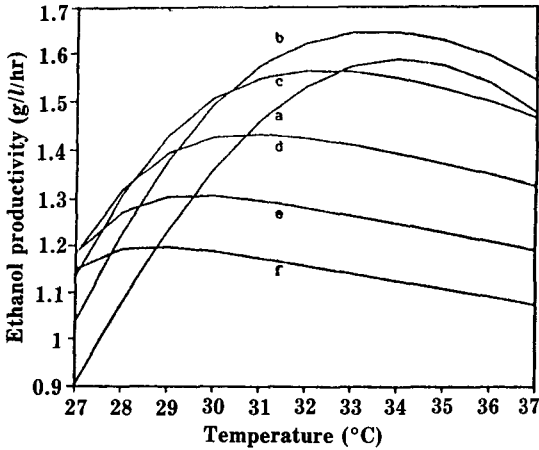


Fig. 2. Productivity vs. temperatures for various fermentation period.

(a: 15, b: 18, c: 21, d: 24, e: 27, f: 30 hours)

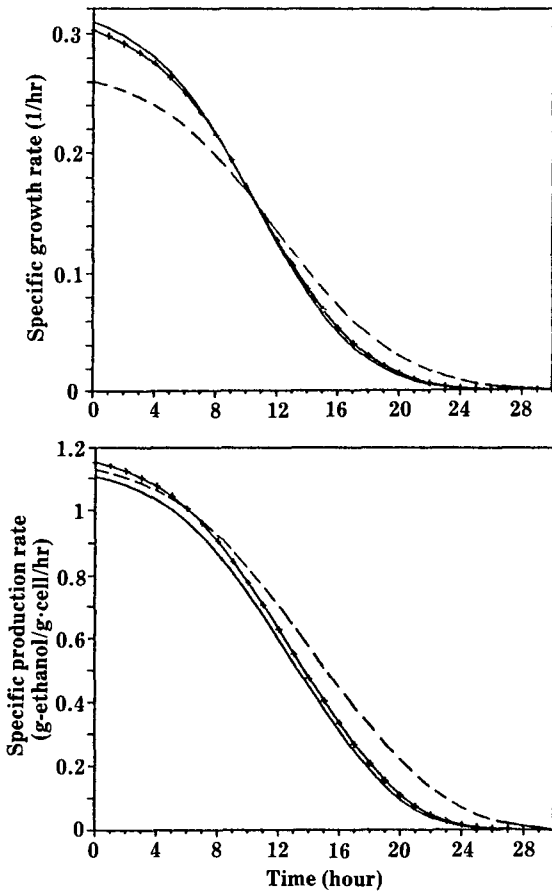


Fig. 3. Specific growth rate and specific production rate vs. time for various temperatures.

(---: 30°C, ++: 33°C, —: 36°C)

$$P_m = 132.512 - 1.667T$$

$$P'_m = 151.389 - 1.033T$$

$$Y_{p/s} = 0.507 - 0.005T \quad (4)$$

발효공정의 최적화

본 모델식으로부터 여러 가지 배양조건에 대하여 수치모사를 한 결과, Fig.2에서와 같이 최대의 에탄올 생산성은 초기 포도당 농도가 100 g/l인 경우 34°C에서 1.632(g/l/hr)로 나타났다. 또한 이 때의 최대 생산성은 배양시간이 18시간인 경우로서 이 경우를 모델식을 이용하여 수치모사한 결과 잔류포도당 농도가 약 1%이다. 이것은 에탄올에 의한 저해작용이 에탄올 농도가 높은 발효 말기에 매우 심해지므로 포도당을 완전 소모시켜 에탄올 농도를 최대로 하는 것보다는 에탄올의 최종 농도를 약간 낮추는 것이 생산성 향상에 도움이 된다고 하는 것을 의미한다. 수치모사 결과 Fig.3에서와 같이 배양 초기에는 36°C 정도로 온도를 높여 배양하고 배양 말기에는 30°C 정도로 온도를 낮추어 배양하면 성장속도를 최대로 할 수 있으며, 또한 최대의 비생산속도는 발효 초기에는 33°C 근처에서 얻어지고 점차 에탄올이 생성될수록 30°C에서 얻어진다. 즉 에탄올 발효에 있어서 초기에는 높은 온도로 세포농도를 증가시킨 다음 발효가 진행됨에 따라 점차 온도를 낮추어 에탄올 저해작용을 감소시키는 것이 최적의 배양방식임을 알 수 있다.

요 약

효모의 성장 및 에탄올 생산에 미치는 온도의 영향에 대해서 회분식 배양을 실시한 결과 최대의 비효모 성장속도를 나타내는 온도는 36°C였고 최대의 비에탄올 생산속도를 나타내는 온도는 33°C임을 알 수 있었다. 온도의 영향에 대한 실험을 토대로 수학적 모델식을 선정했으며 매개변수를 추정하여 모사를 해 본 결과 배양 초기에는 36°C 정도의 온도에서 배양하다가 점차로 온도를 낮추어 30°C 정도로 배양하는 것이 최적의 발효공정임을 알 수 있었다.

사용기호

X : cell mass concentration (g/l)

S : substrate concentration (g/l)

P : ethanol concentration (g/l)

μ_m : specific growth rate at ethanol concentration P (hr⁻¹)

V_m : maximum specific ethanol production rate
(g ethanol/g yeast cell/hr)
 K_s : saturation concentration for growth (g/l)
 K'_s : saturation concentration for product formation (g/l)
 P_m : maximum ethanol concentration above which cells do not grow (g/l)
 P'_m : maximum ethanol concentration above which cells do not produce ethanol (g/l)
 $Y_{p/s}$: product yield coefficient (g ethanol/g glucose)

사 사

본 연구는 동력자원부의 대체에너지개발 연구비와 (주)유공의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Maiorella, B.L., H.W. Blanch and C.R. Wilke: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1003 (1984).
2. Ciftci, T., A. Constantiides and S.S. Wang: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2007 (1983).
3. Loureiro, V. and N. Van Uden: *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1881 (1982).
4. Sa-Correia, I. and N. Van Uden: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 1665 (1983).
5. Nanba, A., Y. Nishizawa, Y. Tsuchiya and S. Nagai: *J. Ferment. Technol.* **65**(3), 277 (1987).
6. Gray, W.D. and C. Sova: *J. Bacteriol.*, **72**, 349 (1956).
7. Nagodawithana, T.W. and K.H. Stinkraus: *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**(2), 158 (1976).
8. Navarro, J.M. and G. Durand: *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **129B**, 215 (1978).
9. Krouwel, P.G. and L. Braber: *Biotech. Lett.*, **1**(10), 403 (1979).
10. Stokes, J.L.: *The Yeasts, Acad. Press*, **2**, 119 (1971).
11. Miller, G.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959).
12. Lee, J.H.: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 23 (1983).
13. Luong, J.H.T.: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 280 (1985).
14. Aiba, S., M. Shoda and M. Nagatani: *Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 845 (1968).

(Received October 4, 1989)